

19/9/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI

(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

003144111

WPI Acc No: 1981-04653D/198104

**Cultivation of coenzyme-Q producing yeast or bacteria - in medium contg.**

**choline, methionine or a betaine to increase coenzyme yield**

Patent Assignee: MITSUBISHI GAS CHEM IND CO LTD (MITN )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 55148084	A	19801118				198104 B
JP 82041903	B	19820906				198239

Priority Applications (No Type Date): JP 7956054 A 19790508

Abstract (Basic): JP 55148084 A

Examples of the bacteria are Pseudomonas extraquens,  
Pseudomonas

rosea, Microcycclus aquaticus, Microcycclus ebruneus, etc. Suitable  
yeasts are Candida curvata, Candida humicola, Torulopsis  
capsuligenus,

Rhodotolura glutinis, Rhodotolura rubra, Cryptococcus albidus, etc.  
The

choline is added as choline, choline HCl, or choline citrate.

Examples

of the betaine cpd. are glycine betaine, gamma-butyrobetaine and  
their

salts (e.g. HCl).

Pref. choline, methionine and betaine cpd. are added in an amt.  
of

0.3-0.01w/w.%. The cultivation is carried out in a medium contg. a  
C

and N source, an inorganic cpd. and opt. a vitamin or an amino acid  
at

20-45 deg.C and pH 2-6.

Title Terms: CULTIVATE; COENZYME-Q; PRODUCE; YEAST; BACTERIA; MEDIUM;

CONTAIN; CHOLINE; METHIONINE; BETAINE; INCREASE; COENZYME; YIELD

Derwent Class: B05; D16

International Patent Class (Additional): C12N-001/20; C12P-007/66;

C12R-001/01

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B02C1; D05-C03

Chemical Fragment Codes (M1):

\*02\* V800 G100 M531 L951 H541 H542 H711 H722 H723 M240 M232 M233 M331  
M333 N130 M510 M520 M540 M720 M414 M902

Chemical Fragment Codes (M2):

\*01\* K0 H5 H7 M282 M210 M211 M226 M231 M232 M240 M270 M311 M316 M320  
G100

M531 L951 H541 H542 H711 H722 H723 N130 M510 M520 M540 M720 M414  
M902

?

⑫ 公開特許公報 (A)

昭55-148084

⑤Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

库内整理番号

④公開 昭和55年(1980)11月18日

C 12 N 1/20'

7235-4 B

発明の数 1

1/16

7235—4 B

審查請求 有

C 12 P 7/66

6760--4 B

// C 12 R 1/01

1/05

1/38

1/645

1/72

1/78

1/84

1/88

2/55

(全 11 頁)

#### ⑤4 微生物の培養方法

新潟市宝町 5 の33

②特 願 昭54—56054

⑦出願人 三菱瓦斯化学株式会社

②出 願 昭54(1979)5月8日

東京都千代田区丸の内2丁目5  
番2号

⑦2 発 明 者 蝦名誠治



## 1 発明の名称

微生物の培養方法

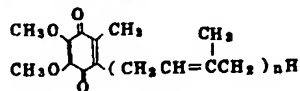
## 2 特許請求の範囲

補酵素Qを生産する細菌または酵母を培養するに際し、コリン、メチオニンまたはベタイン類を含有させた培地または培養液中で該細菌または酵母を培養して、菌体の補酵素Qの生産性を増大させることを特徴とする微生物の培養方法

### 3 発明の詳細な説明

本発明は補酵素Qを生産する細菌または酵母を培養する方法に關し、さらに詳細には菌体の補酵素Qの生産性を増大させるための補酵素Qを生産する細菌または酵母を培養する方法に係わる。

補酵素 Q は一般式



(ただし式中  $n$  は  $6 \sim 12$  の整数)

で示される化合物であり、 $n$ が8、9または10特に10の化合物が医薬として広く使用されつつある。

補酵素Qは、工業的には発生物学的方法により製造されているのが一般であるが、この工業的製造法においては、微生物は増殖速度が大きくしかも生産管理が極めて容易であるとの多くの長所を有するが、反面、菌体の補酵素Qの含有率が低く生産性が低いことが一つの大きな欠点とされている。

本発明者は、菌体の補酵素Qの含有率を増大させるため、各種培養条件などを検討した結果、培地または培養液に特定の化合物を含有させてこれらの微生物を培養することにより、菌の増殖速度を低下させることなく菌体の補酵素Qの含有率を増大させ、もつて生産性を増大させ得るとの新知見を得、この新知見に基づいて本発明に到達した。

すなわち、本発明は、補酵素Qを生産する細

菌または酵母を培養するに、コリン、メチオニンまたはベタイン類を含有させた培地または培養液中で該細菌または酵母を培養して、菌体の補酵素Qの生産性を増大させることを特徴とする微生物の培養方法である。

本発明での補酵素Qを生産する細菌または酵母とは補酵素Qを生産するものであれば特に制限はない。細菌としてはたとえばシユードモナス エクストラクエンス (*Pseudomonas extraquens*) およびシユードモナス ローゼア (*Pse. rosea*) などのシユードモナス属、ミクロチクルス アキユアティクス (*Microcycilus aquaticus*) およびミクロチクルス エブルネウス (*Mic. ebruneus*) などのミクロチクルス属、プロタミノバクター ルバー (*Protaminobacter ruber*) などのプロタミノバクター属、パラコツカス デニトリフィカンス (*Paracoccus denitrificans*) などのパラコツカス属、キサントモナス アンペリナ (*Xanthomonas ampelina*) などのキサントモナス属、アグロバクテリウム チュムプアシ

エンス (*Agrobacterium tumefaciens*) などのアグロバクテリウム属、アルカリゲネス フェカリス (*Alcaligenes faecalis*) などのアルカリゲネス属、ロドスピリラム ルブラム (*Rhodospirillum rubrum*) などのロドスピリラム属、ロドシユードモナス スフェロイデス (*Rhodopseudomonas sphaeroides*) などのロドシユードモナス属などに属する細菌などがあり、これらのうちでパラコツカス属およびシユードモナス属、ロドスピリラム属およびロドシユードモナス属に属する細菌が好ましい。

また酵母としては、キャンディダ クルバータ (*Candida curvata*) およびキャンディダ ヒューミコラ (*Cand. humicola*) などのキャンディダ属、トルロプシス カプシユリゲネス (*Torulopsis capauligenus*) などのトルロプシス属、ロドトルラ グルチニス (*Rhodotulura glutinis*) およびロドトルラ ルブラ (*Rhod. rubra*) などのロドトルラ属、クリプトコツカス アルビダス (*Cryptococcus albidus*)、スポロボロマ

- 3 -

- 4 -

イセス ホルサタイカス (*Sporobolomyces holstianus*) などのスポロボロマイセス属、ハンセヌラ ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*) などのハンセヌラ属、ピチア アガノビイ (*Pichia aganobii*) などのピチア属、およびトリコスボロン クタニウム (*Trichosporon cutaneum*) などのトリコスボロン属などに属する酵母があり、これらのうちでキャンディダ属、トルロプシス属、ロドトルラ属およびクリプトコツカス属などに属する酵母が好ましく、また、スポロボロマイセス属およびトリコスボロン属に属する酵母が特に好ましい。

培地または培養液に含有せしめられる特定の化合物はコリン、メチオニンまたはベタイン類である。

コリンとは、 $(\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3)^+\text{OH}^-$  で示される化合物である。また水中でコリンを生成する化合物たとえば塩化コリンおよびコリンのくえん酸塩などのコリン塩なども使用しうる。

メチオニンとしてL-メチオニン、D-メチオニンおよびD-メチオニンのいずれをも使用し得るが、実用上好ましくはL-メチオニンおよびD-メチオニンを使用することが好ましい。

ベタイン類は、分子中に陽イオンとして第4級アンモニウムを陰イオンとしてカルボン酸をもつた分子内塩であつて、このうち、実用上好ましいベタイン類はグリシンベタインおよびアーブチロベタインであり、これらのうちグリシンベタインが最も好ましい。グリシンベタインのほか水中でグリシンベタインを生成する化合物たとえばグリシンベタインの塩酸塩などのグリシンベタイン塩を使用することができる。なお、これらの化合物は単独または混合して使用することができる。

これらの特定の化合物の培地または培養液中の濃度は生育または増殖を著しく抑制しない濃度であればよい。またこの濃度は培養時の培養液の固形濃度により多少異なる。たとえばコリン、

- 5 -

- 6 -

グリシンベタインおよびメチオニンのそれぞれの濃度は通常実用されている菌体濃度では0.5 wt%以下好ましくは0.3~0.01 wt%とすることが好ましい。

培養は回分式および連続式のいずれによつても可能である。

これらの特定の化合物は、回分培養のときは培養前に培地に含有させてもよく、また培養中の培養液に含有させてもよいが、コリンおよびベタイン類のときは前者が実用上好ましく、メチオニンのときには後者特に菌が対数増殖期の前期または中期に含有させることが好ましい。連続培養のときには培養前の培地に含有させる。

これらの特定な化合物は補酵素Q生成のための前駆物質として作用するものと推察される。

他の培地成分は常法の如くでよく、使用する微生物の種類などにより適宜選択される。

炭素源は、使用する微生物が酸化しうる物質であればよく、たとえば糖質、ペプトンおよび肉エキスなどの天然物あるいはグルコースおよ

びフラクトースなど、アルコール、メタノールおよび1-プロパノールなどのアルコール類、ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドなどのアルデヒド類、メチルアミン、ジメチルアミンおよびトリメチルアミンなどのアミン類、酢酸、ギ酸、ピルビン酸およびオキサロ酸などの有機酸ならびにパラフィンなどの炭化水素などがある。窒素源としては尿素および塩安などのアンモニウム塩、ならびに尿素、コーン・ステイブ・リカー、カゼイン、ペプトンおよび酵母エキスなどの有機窒素含有物が用いられる。その他、無機化合物としてはたとえばカルシウム化合物、ナトリウム化合物、りん酸塩、マンガ化合物、亜鉛化合物、鉄化合物、モリブデン化合物、コバルト化合物、ほう素化合物およびよう素化合物などが用いられる。さらにビタミン類およびアミノ酸などの生育に必須な物質あるいは生長促進物質を添加することが好ましい。

培養温度および培養pHなどの培養条件は使

- 7 -

- 8 -

用される微生物の生育または増殖が阻害されないような通常の培養条件を適宜決定すればよい。細菌を使用する場合には実用上、培養温度はたとえば20~45℃、培養pHはたとえば5~8から適宜選択される。また酵母を使用する場合には実用上培養温度はたとえば20~40℃、培養pHは2~6から適宜選択される。

本発明では、増殖速度を低下させることなく菌体の補酵素Q<sub>10</sub>の含有率は勿論のこと他の補酵素Qの含有率も増大せしめられ、もつて補酵素Qの生産性が増大せしめられ、工業的価値は極めて大きい。

実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

#### 実施例 1

下記の基礎培地を使用して28℃で12時間振とう培養して得られたパラコツカス デニトリフィカンス (IFO 13301) の培養液を前培養液として本培養を行なつた。

#### 基礎培地組成

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.4g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.0g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.0g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2g
酵母エキス	0.1g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	50mg
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	30mg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10mg
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10mg
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.5mg
EtOH	10g

これに蒸留水を加えて1ℓとする。

pH 7.2

本培養では上記の基礎培地にさらに塩化コリンおよびグリシンベタインをそれぞれ基礎培地に対して0.15 wt%となるように添加した培地150 mlを1ℓ容フラスコに入れ、120℃で15分間滅菌したのち、前培養液0.2 mlを添加し、28℃で12時間回転振とう培養(22

- 9 -

- 10 -

0 7.p.m)を行なつた。この菌液 1.5 ml を集め、これから菌体を分離した。この菌体についての結果を第 1 表に示す。

第 1 表

	世代時間 (hr)	補酵素 Q <sub>10</sub> 含有率 (μg/g 乾燥菌体)
塩化コリン	2.0	1350
グリシンベタイン	2.2	1280

菌体からの補酵素 Q<sub>10</sub> の抽出はつぎのようにして行なつた。すなわち、湿菌体 5 g にエタノール 30 ml、ピロガロール 2 g および 60% (W/V) 苛性ソーダ水溶液 5 ml を混合し、この液を還流下で 25 分間けん化を行ない、けん化終了後急冷し、これに 50 ml の水を加え、n-ヘキサンで 3 度抽出し、得られたヘキサン層を 5 度水洗し、ついでヘキサン層に残存する水を無水硫酸で脱水したのち、ヘキサン層を減圧蒸餾して乾燥する。

補酵素 Q<sub>10</sub> の定量は、クラベン法 (CRAVEN'S

-11-

第 2 表

	世代時間 (hr)	補酵素 Q <sub>10</sub> 含有率 (μg/g 乾燥菌体)
0.05 wt% のとき	3.5	1420
0.10 wt% のとき	3.5	1400

比較例 1

実施例 1 において、本培養で塩化コリンおよびグリシンベタインを加えなかつた以外は全く同様にして行なつた。その結果、世代時間は 2.3 時間および補酵素 Q<sub>10</sub> 含有率は 1040 μg/g 乾燥菌体であつた。

実施例 3

実施例 1 と同様な基礎培地に、基礎培地に対して 0.10 wt% となるようにメチオニンを添加した培地を使用して連続培養を行なつた。連続培養の条件は培養温度 37℃、培養 pH 7.1 および平均滞留時間 5.3 時間とした。定常状態における菌体の補酵素 Q<sub>10</sub> の含有率は 11

-13-

特開 55-148084(4)

TEST) ("METHODS OF BIOCHEMICAL ANALYSIS" VOL. XI) に準じた。すなわち、上記の乾燥した試料をエタノールに溶解し、これにエタノール 0.2 N 苛性カリ液およびシアノ酢酸エチルを加えて補酵素 Q<sub>10</sub> を発色せしめ 625 mμ の吸光度を測定し、予め標準補酵素 Q<sub>10</sub> により得た検量線により含有量を算出した。

なお、補酵素 Q<sub>10</sub> の抽出および定量は、以下の実施例および比較例でも同様に行なつた。

実施例 2

実施例 1 において塩化コリンおよびグリシンベタインのかわりにメチオニンを基礎培地に対して 0.05 wt% および 0.10 wt% となるように添加した以外は全く同様にして行なつた。結果を第 2 表に示す。

-12-

80 μg/g 乾燥菌体であつた。

比較例 2

実施例 3 においてメチオニンを添加しない培地を使用したほかは同じ条件で連続培養を行なつた。定常状態における菌体の補酵素 Q<sub>10</sub> の含有率は 1010 μg/g 乾燥菌体であつた。

特許出願人 三菱瓦斯化学株式会社  
代表者 相川 泰吉

-14-

昭和54年8月28日

特許庁長官 殿

## 1. 事件の表示

昭和54年特許願第56054号

## 2. 発明の名称

微生物の培養方法

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所（〒100）東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

名称（446）三菱瓦斯化学株式会社

代表者 相川 孝吉

（電話番号 283-5125～5130）

## 4. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の項

- 1 -

## 実施例5

酵母スボロボロミセス・ホルサティカス（IFO 1032）を以下の培地組成で28℃で振とう培養を行なった。

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.0g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.0g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.4g, NaCl 0.1g, 酵母エキス 0.2g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 50mg, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 30mg, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10mg, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 10mg, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.5mg, EtOH 10g および塩化コリン 1g, これに蒸留水を加え1ℓとし、pHを4.7に調整した。48時間培養したのち集菌し、実施例1と同様に補酵素Q<sub>10</sub>の含有率を測定したところ780μg/g乾燥菌体であつた。

## 比較例3

スボロボロミセス・ホルサティカス（IFO 1032）を用い、実施例5で用いた培地から塩化コリンを除いた培地を使用したほかは全く同様に培養を行なったところ補酵素

- 3 -

## 5. 補正の内容

- (1) 第12頁「実施例2」の本文第2行および第13頁「実施例3」の本文第3行のそれぞれの「メチオニン」のまえに「L-」を挿入する。  
 (2) 第14頁の末尾「であつた。」のあとに下記の文章を追加する。

## 「実施例4

実施例1の基礎培地に塩化コリンの添加量のみを種々変えて、培地を作成し、パラコックス・デトリフィカンス（IFO 13301）を植菌し、同様に培養し、塩化コリンの添加量の補酵素Q<sub>10</sub>含有率に及ぼす効果を調べた。結果を第3表に示した。

第3表

塩化コリン添加量 (重量%)	補酵素Q <sub>10</sub> 含有率 (μg/g乾燥菌体)
0.50	1310
0.15	1300
0.05	1270
0.025	1210
0.013	1090
0	1020

- 2 -

Q<sub>10</sub>含有率は650μg/g乾燥菌体であつた。

## 実施例6

トリコスポロン・クタニウム（IFO 1200）を実施例5と同様に培養したところ補酵素Q<sub>10</sub>含有率は950μg/g乾燥菌体であつた。

## 比較例4

トリコスポロン・クタニウム（IFO 1200）を用い塩化コリンを添加しない培地を用いたほかは実施例6と同様にして行なったところ補酵素Q<sub>10</sub>含有率は760μg/g乾燥菌体であつた。

## 実施例7

ロドスピリラム・ルブラム（IFO 3986）を用い、実施例1で用いた基礎培地に塩化コリン0.1重量%およびNaHCO<sub>3</sub>0.3

- 4 -

gを添加した培地を作成し、1ℓ三角フラスコに培地350mlを入れ、220rpm、30℃で下で暗室にて振とう培養を行なった。約48時間後に集菌し、補酵素Q<sub>10</sub>含有率を測定したところ260.0μg/g乾燥菌体であつた。

#### 実施例8

実施例7で添加した塩化コリンのかわりにグリシンペタインの塩酸塩を0.01重量%添加したほかは全く同様にして行なつたところ補酵素Q<sub>10</sub>含有率は245.0μg/g乾燥菌体であつた。

#### 比較例5

グリシンの塩酸塩を除いた培地を用いたほかは実施例8と同様にして行なつたところ、補酵素Q<sub>10</sub>含有率は193.0μg/g乾燥菌体であつた。

- 5 -

た基礎培地に、塩化コリン 0.10重量%  
および(Na)  
およびNHCO<sub>3</sub> 0.3gをさらに添加した培地を1ℓ三角フラスコに200ml張り込み、220rpm、30℃で下で暗室にて振とう培養を行なった。約48時間後に集菌し、補酵素Q<sub>10</sub>含有率を測定したところ83.0μg/g乾燥菌体であつた。

#### 比較例7

実施例10で塩化コリンを除いた培地を用いたほかは全く同様にして行ない、得られた菌体の補酵素Q<sub>10</sub>含有率を測定したところ70.0μg/g乾燥菌体であつた。

- 7 -

#### 実施例9

シュードモナス・ローゼア(NCIB 10610)を実施例1の基礎培地で炭素源をエタノールを<sup>(カ)</sup>メタノールに変えた培地に、さらに塩化コリンを0.1重量%添加した培地を作成し、同様な培地組成で前培養したシュードモナス・ローゼアを接種し、30℃で培養し、得られた菌体について補酵素Q<sub>10</sub>含有率を測定したところ86.0μg/g乾燥菌体であつた。

#### 比較例6

実施例9で塩化コリンを除いた培地を用いたほかは全く同様にして行ない、得られた菌体の補酵素Q<sub>10</sub>含有率を測定したところ75.0μg/g乾燥菌体であつた。

#### 実施例10

ロドシュードモナス・スフェロイデス(IFO 12203)を用い、実施例1で用い

- 6 -

#### 手続補正書(自発)

昭和55年 11月24日

特許庁長官 川原 能雄 殿

#### 1. 事件の表示

昭和54年 特許願 第56054号

#### 2. 発明の名称

微生物の培養方法

#### 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所(〒100) 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

名称(446) 三菱瓦斯化学株式会社

代表者 相川 豊吉

(電話番号 283-5125-5130)

#### 4. 補正の対象

明細書の特許請求の範囲の欄および発明の詳細な

説明の欄

#### 5. 補正の内容

別紙「訂正明細書」のとおり

(ただし式中nは12の整数)

で示される化合物であり、nが8、9または10特に10の化合物が医薬として広く使用されつつある。

補酵素Qは、工業的には微生物学的方法により製造されているのが一般であるが、この工業的製造法においては、微生物は増殖速度が大きくしかも生産管理が極めて容易であるとの多くの長所を有するが、反面、菌体の補酵素Qの含有率が低く生産性が低いことが一つの大きな欠点とされている。

本発明者は、菌体の補酵素Qの含有率を増大させるため、各種培養条件などを検討した結果、培地または培養液中に特定な化合物を含有させてこれらの微生物を培養することにより、菌の増殖速度を低下させることなく菌体の補酵素Qの含有率を増大させ、もつて生産性を増大させ得るとの新知見を得、この新知見に基づいて本発明に到達した。

すなわち、本発明は、補酵素Qを生産する細

## 1 発明の名称

微生物の培養方法

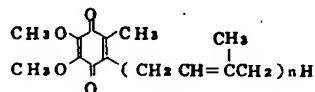
## 2 特許請求の範囲

補酵素Qを生産する細菌または酵母を培養するに際し、コリンまたはベタイン類を含有させた培地または培養液中で該細菌または酵母を培養して、菌体の補酵素Qの生産性を増大させることを特徴とする微生物の培養方法

## 3 発明の詳細な説明

本発明は補酵素Qを生産する細菌または酵母を培養する方法に関し、さらに詳細には菌体の補酵素Qの生産性を増大させるための補酵素Qを生産する細菌または酵母を培養する方法に係わる。

補酵素Qは一般式



- 1 -

菌または酵母を培養するに際し、コリンまたはベタイン類を含有させた培地または培養液中で該細菌または酵母を培養して、菌体の補酵素Qの生産性を増大させることを特徴とする微生物の培養方法である。

本発明での補酵素Qを生産する細菌または酵母とは補酵素Qを生産するものであれば特に制限はない。細菌としてはたとえばシュードモナス エクストラクエンズ (*Pseudomonas extraquena*) およびシュードモナス ローゼア (*Pae. rosea*) などのシュードモナス属、マイクロチクルス アクィアティクス (*Microcycilus aquaticus*) およびマイクロチクルス エブルネウス (*Micr. ebruneus*) などのマイクロチクルス属、プロタミノバクター ルバー (*Protaminobacter ruber*) などのプロタミノバクター属、パラコツカス デニトリフィカンス (*Paracoccus denitrificans*) などのパラコツカス属、キサントモナス アンペリナ (*Xanthomonas ampelina*) などのキサントモナス属、アグロバクテリウム チュメファシ

- 3 -

エンス (*Agrobacterium tumefaciens*) などのアグロバクテリウム属、アルカリゲネス フェカリス (*Alcaligenes faecalis*) などのアルカリゲネス属、ロドスピリラム ルブルム (*Rhodospirillum rubrum*) などのロドスピリラム属、ロドシユードモナス スフェロイデス (*Rhodopseudomonas sphaeroides*) などのロドシユードモナス属などに属する細菌などがあり、これらのうちでパラコツカス属およびシュードモナス属、ロドスピリラム属およびロドシユードモナス属に属する細菌が好ましい。

また酵母としては、キャンディダ クルバータ (*Candida curvata*) およびキャンディダ ヒューミコラ (*Cand. humicola*) などのキャンディダ属、トルロプシス カプシユリゲネス (*Torulopsis capsuligenus*) などのトルロプシス属、ロドトルラ グルチニス (*Rhodotulura glutinis*) およびロドトルラ ルブラ (*Rhod. rubra*) などのロドトルラ属、クリプトコツカス アルビダス (*Cryptococcus albidus*)、スポロボロマ

- 4 -



イセス ホルサテカス (*Sporobolomyces holzschugii*)  
 などのスポロボロマイセス属、ハンセンラ ポ  
 リモルフア (*Hansenula polymorpha*) などのハン  
 セヌラ属、ピチア アガノビイ (*Pichia aganobil*)  
 などのピチア属、およびトリコスボロン クタ  
 ニウム (*Trichosporon cutaneum*) などのトリコ  
 スボロン属などに属する酵母があり、これらの  
 うちでキャンディダ属、トルロブシス属、ロド  
 トルラ属およびクリプトコックス属などに属す  
 る酵母が好ましく、また、スポロボロマイセス  
 属およびトリコスボロン属に属する酵母が特に  
 好ましい。

培地または培養液に含有せしめられる特定の  
 化合物はコリンまたはベタイン類である。

コリンとは、 $(\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3)^+\text{OH}^-$   
 で示される化合物である。また水中でコリンを  
 生成する化合物たとえば塩化コリンおよびコリン  
 のくえん酸塩などのコリン塩なども使用しう  
 る。

ベタイン類は、分子中に陽イオンとして第4

- 5 -

これらの特定の化合物は、回分培養のときは  
 培養前に培地に含有させてもよく、また培養途  
 中の培養液に含有させてもよいが、コリンおよ  
 びベタイン類のときは前者が実用上好ましい。  
 連続培養のときには培養前の培地に含有させる。  
 他の培地成分は常法の如くでよく、使用する  
 微生物の種類などにより適宜選択される。

炭素源は、使用する微生物が酸化しうる物質  
 であればよく、たとえば糖蜜、ペプトンおよび  
 肉エキスなどの天然物あるいはグルコースおよ  
 びフラクトースなどの糖類、メタノール、エタ  
 ノールおよび1-プロパノールなどのアルコー  
 ル類、ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒ  
 ドなどのアルデヒド類、メチルアミン、ジメチ  
 ルアミンおよびトリメチルアミンなどのアミン  
 類、酢酸、ギ酸、ピルビン酸およびオキサロ酸  
 などの有機酸ならびにパラフィンなどの炭化水  
 素などがある。窒素源としては硫酸および塩安  
 などのアンモニウム塩、ならびに尿素、コーン  
 ・ステイブ・リカー、カゼイン、ペプトンお

- 7 -

級アンモニウムを、また陰イオンとしてカルボ  
 ン酸をもつた分子内塩であつて、このうち、実  
 用上好ましいベタイン類はグリシンベタインお  
 よびアーブチロベタインであり、これらのうち  
 グリシンベタインが最も好ましい。グリシンベ  
 タインのほかに水中でグリシンベタインを生成  
 する化合物たとえばグリシンベタインの塩酸塩  
 などのグリシンベタイン塩を使用することがで  
 きる。なお、これらの化合物は単独または混合  
 して使用することができる。

これらの特定の化合物の培地または培養液中  
 の濃度は生育または増殖を著しく抑制しない濃  
 度であればよい。またこの濃度は培養時の培養  
 液の菌体濃度により多少異なる。たとえばコリン  
 およびグリシンベタインのそれぞれの濃度は通  
 常実用されている菌体濃度では0.5 wt%以下  
 好ましくは0.01~0.3 wt%とすることが  
 好ましい。

培養は回分式および連続式のいずれによつて  
 も可能である。

- 6 -

および酵母エキスなどの有機窒素含有物が用いら  
 れる。その他、無機化合物としてはたとえばカル  
 シウム化合物、ナトリウム化合物、りん酸塩、  
 マンガン化合物、亜鉛化合物、鉄化合物、モリ  
 ブデン化合物、コバルト化合物、ほう素化合物  
 およびよう素化合物などが用いられる。さらに  
 ビタミン類およびアミノ酸などの生育に必須な  
 物質あるいは生長促進物質を添加することが好  
 ましい。

培養温度および培養 pH などの培養条件は使  
 用される微生物の生育または増殖が阻害されな  
 いような通常の培養条件を適宜決定すればよい。  
 細菌を使用する場合には実用上、培養温度はた  
 とえば20~45℃、培養 pH はたとえば5~  
 8から適宜選択される。また酵母を使用する場  
 合には実用上培養温度はたとえば20~40℃、  
 培養 pH は2~6から適宜選択される。

本発明では、増殖速度を低下させることなく  
 菌体の補酵素 Q<sub>10</sub> の含有率は勿論のこと他の補  
 酵素 Q の含有率も増大せしめられ、もつて補酵

- 8 -

素Qの生産性が増大せし、工業的価値は極めて大きい。

実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

#### 実施例 1

下記の基礎培地を使用して28℃で12時間振とう培養して得られたパラコツカス デニトリファイカンス (I F O 13301) の培養液を前培養液として本培養を行なった。

##### 基礎培地組成

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.4g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	4.0g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3.0g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2g
酵母エキス	0.1g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	50mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10mg

して行なった。すなわち、湿菌体5gにエタノール30ml、ピロガロール2gおよび60多(W/V)苛性ソーダ水溶液5mlを混合し、この液を煮沸下で25分間けん化を行ない、けん化終了後急冷し、これに50mlの水を加え、ローヘキサンで3度抽出し、得られたヘキサン層を3度水洗し、ついでヘキサン層に残存する水を無水硫酸で脱水したのち、ヘキサン層を減圧濃縮して乾燥した。

補酵素Q<sub>10</sub>の定量は、クラベン法(CRAVEN'S TEST) ("METHODS OF BIOCHEMICAL ANALYSIS" VOL. XI) に準じた。すなわち、上記の乾燥した試料をエタノールに溶解し、これにエタノール性0.2N苛性カリ液およびシアノ酢酸エチルを加えて補酵素Q<sub>10</sub>を発色せしめ625mμの吸光度を測定し、予め標準補酵素Q<sub>10</sub>により得た検量線により含有量を算出した。

なお、補酵素Q<sub>10</sub>の抽出および定量は、以下の実施例および比較例でも同様に行なった。

特開昭55-148084(9)

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.5mg  
エタノール 10g

これに蒸留水を加えて1ℓとする。

pH 7.2

本培養では上記の基礎培地にさらに塩化コリンおよびグリシンベタインをそれぞれ基礎培地に対して0.15wt%となるように添加した培地150mlを1ℓ容フラスコに入れ、120℃で15分間滅菌したのち、前培養液0.2mlを添加し、28℃で12時間回転振とう培養(220r.p.m.)を行なった。この培養液1.5ℓを集め、これから菌体を分離した。この菌体についての結果を第1表に示す。

第1表

	世代時間 (hr)	補酵素Q <sub>10</sub> 含有率 (μg/g乾燥菌体)
塩化コリン	2.0	1350
グリシンベタイン	2.2	1280

菌体からの補酵素Q<sub>10</sub>の抽出はつぎのように

#### 比較例 1

実施例1において、本培養で塩化コリン及びグリシンベタインのいずれをも加えなかった以外は全く同様にして行なった。その結果、世代時間は2.3時間および補酵素Q<sub>10</sub>含有率は1040μg/g乾燥菌体であつた。

#### 実施例 2

実施例1の基礎培地に塩化コリンの添加量のみを種々変えて、培地を作成し、パラコツカス デニトリファイカンス (I F O 13301) を接種し、同様に培養し、塩化コリンの添加量の補酵素Q<sub>10</sub>含有率に及ぼす効果を調べた。結果を第2表に示した。

第2表

塩化コリン添加量 (重量%)	世代時間 (時間)	補酵素Q <sub>10</sub> 含有率 (μg/g乾燥菌体)
0.50	2.0	1310
0.15	2.0	1300
0.05	2.1	1270
0.025	2.0	1210
0.013	2.2	1090
0	2.3	1020

## 実施例 3

酵母スプロボロ<sup>(イ)</sup>セス ホルサテिकास (IFO 1032) を以下の培地組成で 28℃ で振とう培養を行なった。

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.0g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.0g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.4g, NaCl 0.1g, 酵母エキス 0.2g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 50mg, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 30mg, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10mg, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 10mg, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.5mg, エタノール 10g および塩化コリン 1g, これに蒸留水を加え 1ℓ とし、pH を 4.7 に調整した。48 時間培養したのち集菌し、実施例 1 と同様に補酵素 Q<sub>10</sub> の含有率を測定したところ 780 μg/g 乾燥菌体であり、世代時間は 8.6 時間であつた。

## 比較例 2

スプロボロ<sup>(イ)</sup>セス ホルサテिकास (IFO 1032) を用い、実施例 3 で用いた培地から塩化コリンを除いた培地を使用したほかは全く

コリン 0.1 重量% および NaHCO<sub>3</sub> 0.3g を添加した培地を作成し、1ℓ 三角フラスコに培地 350 ml を入れ、220 rpm, 30℃ で暗室にて振とう培養を行なった。約 48 時間後に集菌し、補酵素 Q<sub>10</sub> 含有率を測定したところ 2600 μg/g 乾燥菌体であり、世代時間は 9.1 時間であつた。

## 実施例 6

実施例 5 で添加した塩化コリンのかわりにグリシンベタインの塩酸塩を 0.01 重量% 添加したほかは全く同様に行なつたところ、補酵素 Q<sub>10</sub> 含有率は 2450 μg/g 乾燥菌体であり、世代時間は 9.0 時間であつた。

## 比較例 4

グリシンベタインの塩酸塩を除いた培地を用いたほかは実施例 6 と同様に行なつたところ、補酵素 Q<sub>10</sub> 含有率は 1930 μg/g 乾燥菌体であり、世代時間は 9.1 時間であつた。

同様に培養を行なったところ、補酵素 Q<sub>10</sub> 含有率は 650 μg/g 乾燥菌体であり、世代時間は 8.5 時間であつた。

## 実施例 4

トリコスポロン クタニウム (IFO 1200) を実施例 3 と同様に培養したところ、補酵素 Q<sub>10</sub> 含有率は 950 μg/g 乾燥菌体であり、世代時間は 6.5 時間であつた。

## 比較例 3

トリコスポロン クタニウム (IFO 1200) を用い塩化コリンを添加しない培地を用いたほかは実施例 4 と同様に行なつたところ、補酵素 Q<sub>10</sub> 含有率は 760 μg/g 乾燥菌体であり、世代時間は 6.7 時間であつた。

## 実施例 5

ロドスピリラム ルブラム (IFO 3986) を用い、実施例 1 で用いた基礎培地に塩化

## 実施例 7

シュードモナス ローゼア (NCIB 10610) を実施例 1 の基礎培地で炭素源をエタノールからメタノールに変えた培地に、さらに塩化コリンを 0.1 重量% 添加した培地を作成し、同様な培地組成で前培養したシュードモナス ローゼアを接種し、30℃ で培養し、得られた菌体について補酵素 Q<sub>10</sub> 含有率を測定したところ 860 μg/g 乾燥菌体であり、世代時間は 3.5 時間であつた。

## 比較例 5

実施例 7 で塩化コリンを除いた培地を用いたほかは全く同様に行ない、得られた菌体の補酵素 Q<sub>10</sub> 含有率を測定したところ 750 μg/g 乾燥菌体であり、世代時間は 3.5 時間であつた。

## 実施例 8

ロドシュードモナス スフェロイデス (IFO

0 1 2 2 0 3)を用い、1で用いた基  
 礎培地に、塩化コリン 0.10重量%および  
<sup>(H)</sup>  
 $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.3gをさらに添加した培地を1g 1字挿入  
 三角フラスコに200ml張り込み、220 rpm、  
 5 30℃下で暗室にて振とう培養を行なった。約  
 48時間後に集菌し、補酵素Q<sub>10</sub>含有率を測定  
 したところ830μg/g乾燥菌体であり、世代  
 時間は5.5時間であつた。

#### 10 比較例 6

実施例8で塩化コリンを除いた培地を用いた  
 ほかは全く同様にして行ない、得られた菌体の  
 補酵素Q<sub>10</sub>含有率を測定したところ700μg/g  
 乾燥菌体であり、また世代時間は5.5時間で  
 15 あつた。

特許出願人 三菱瓦斯化学株式会社

代表者 相川 泰吉

20